

## ⑱ 公開特許公報 (A) 昭62-134089

⑲ Int.Cl.<sup>4</sup>C 12 N 11/14  
C 12 M 1/40

識別記号

厅内整理番号

⑳ 公開 昭和62年(1987)6月17日

7823-4B  
8114-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

㉑ 発明の名称 バイオリアクタエレメントおよびその製造法

㉒ 特願 昭60-273509

㉓ 出願 昭60(1985)12月6日

㉔ 発明者 浅井克也 名古屋市天白区天白町大字八事字裏山69番地の76 エスボア八事606号室

㉕ 出願人 日本碍子株式会社 名古屋市瑞穂区須田町2番56号

㉖ 代理人 弁理士 杉村暁秀 外1名

## 明細書

1. 発明の名称 バイオリアクタエレメントおよびその製造法

## 2. 特許請求の範囲

1. 酵素を含む微生物が無数の細孔を有し隔壁によって囲まれた複数の平行な貫通孔を有するセラミックハニカム構造体の細孔内部に固定化されているバイオリアクタエレメント。

2. セラミックハニカム構造体の貫通孔の隔壁の平均気孔径が $10\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ である特許請求の範囲第1項記載のバイオリアクタエレメント。

3. セラミックハニカム構造体の気孔率が30%～70%である特許請求の範囲第1項に記載のバイオリアクタエレメント。

4. セラミックハニカム構造体の貫通孔の開口長さが $1\text{ mm} \sim 5\text{ mm}$ である特許請求の範囲第1項記載のバイオリアクタエレメント。

5. 酵素を含む微生物を栄養素を含む水溶液に懸濁させ、次いでこの溶液に無数の細孔を有

し隔壁によって囲まれた複数の平行な貫通孔を有するセラミックハニカム構造体を浸漬してハニカム細孔内部に液を浸透させ、しかる後にこの細孔内部で微生物を培養、増殖させて該微生物を細孔内部に固定させるバイオリアクタエレメントの製造法。

6. セラミックハニカム構造体の貫通孔の隔壁の平均気孔径が $10\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ である特許請求の範囲第5項記載のバイオリアクタエレメントの製造法。

7. セラミックハニカム構造体の気孔率が30%～70%である特許請求の範囲第5項記載のバイオリアクタエレメントの製造法。

8. セラミックハニカム構造体の貫通孔の開口長さが $1\text{ mm} \sim 5\text{ mm}$ である特許請求の範囲第5項記載のバイオリアクタエレメントの製造法。

9. 真空脱気によりハニカム細孔内部の気体と微生物懸濁液とを交換することによって、該懸濁液を細孔内部に浸透させる特許請求の範

囲第5項記載のバイオリニアクタエレメントの  
製造法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (発明の技術分野)

本発明は、生化学反応に使用される酵素を含む微生物をセラミックハニカム構造体に固定したバイオリニアクタエレメント及びその製造法に関するものである。

#### (従来技術の説明)

近年、酵素を含む微生物を用いた生化学反応は急速に発達し、有機合成、食品工業、分析化学等の分野に広く利用されるようになった。この場合、微生物を反応後、生成物等から分離し再利用することが要求され、これに答えるものとして微生物の固定化法の技術が発展してきた。

従来、微生物固定化方法としては、微生物を物理的に担体に吸着させる物理的吸着法、水に不溶性のビーズ状、ペレット状の各種担体に酵素を含む微生物を共有結合させる共有結合法、2個またはそれ以上の官能基をもったグルタルアルデヒド、

ビスジアゾベンジジン等の架橋試薬を用いて担体に微生物を架橋する架橋法、イオン結合により微生物を担体に結合させるイオン結合法、あるいは寒天、カラギーナン等の高分子のゲル格子の中に微生物を包み込むか半透膜性の高分子皮膜で微生物を被覆する包括法等が知られている。

#### (従来技術の問題点)

しかし、共有結合法や架橋法、イオン結合法は固定化によって微生物の性質が変化し、活性低下が大きい等の欠点があり、また包括法は包括調整時での微生物の活性低下に問題点があった。更にまたかかる包括法においては、微生物活性を示すのはゲル表面だけである為、単位菌体量当たりの活性が低くなるという欠点や、圧力損失の増大、固体物による流路の閉塞等の問題があった。

かかる包括法の問題点を解消する技術として担体にセラミックハニカム構造体を用いる固定化法も本件出願人より行われているが(特開昭60-43382号)、この方法においては微生物を含むゲルを付着させる為セラミックハニカム構造体の貫

通孔の開口長さを大きくしなければならず、貫通孔の表面積に限界があった。

また、物理的吸着法においては、従来の担体ではその形状から菌体と液との摩擦力に比べ、担体との相互作用が弱い為、発酵時に微生物が遊離しやすいという問題があった。

そこで、本発明の目的は、微生物固定化時に、微生物活性の低下が低い物理的吸着法において、従来の固定化に比べ固定化微生物量が多くかつ、基質と微生物との接触面積が大きく、担体から微生物が遊離しにくいバイオリニアクタエレメントおよびその製造法を提供することにある。

また本発明の他の目的は、圧力損失や流路の閉塞の問題を解消すると共に、ガス発生を伴う場合は、ガスの散出を容易にするバイオリニアクタエレメントおよびその製造法を提供することにある。  
(問題点を解決するための手段)

本発明者は、上記問題点を解消すべく鋭意研究を行った結果、物理的吸着法においては未だ使用されたことのなかったセラミックハニカム構造体

を担体として使用することにより上記目的を達成し得るバイオリニアクタエレメントおよびその製造法が得られることを見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、酵素を含む微生物が無数の細孔を有し、隔壁によって囲まれた複数の平行な貫通孔を有するセラミックハニカム構造体の細孔内部に固定化されているバイオリニアクタエレメントに関するものである。

また本発明は、酵素を含む微生物を栄養素を含む水溶液に懸濁させ、次いでこの溶液に無数の細孔を有し隔壁によって囲まれた複数の平行な貫通孔を有するセラミックハニカム構造体を浸漬してセラミックハニカム構造体の細孔内部に液を浸透させ、しかる後にこの細孔内部で微生物を培養、増殖させて該微生物を細孔内部に固定させるバイオリニアクタエレメントの製造法に関するものである。

本発明に使用するセラミックハニカム構造体は、アルミナ、ムライト、コージエライト等のセラミ

ック質から成る。これはセラミックハニカム構造体が酵素を含む微生物の固定化に最適の気孔径、気孔率を有すると共に、接触面積が大きく確保でき、かつ圧力損失が小さいという利点を有するからである。

このセラミックハニカム構造体の貫通孔の隔壁の平均気孔径は $10\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは $30\text{ }\mu\text{m} \sim 70\text{ }\mu\text{m}$ である。平均気孔径が $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満であると微生物が細孔に入りにくく、 $100\text{ }\mu\text{m}$ を超えると、微生物が細孔から流出しやすくなるからである。

また、セラミックハニカム構造体の貫通孔の開口長さは $1\text{ mm} \sim 5\text{ mm}$ 、好ましくは $2\text{ mm} \sim 3\text{ mm}$ である。貫通孔の開口長さが $1\text{ mm}$ に満たないと、微生物の固定化が容易かつ均一にならず、また気泡等により流路が閉塞されて圧力損失が急激に増大することがあり、逆に貫通孔の開口長さが $5\text{ mm}$ よりも大きくなると、反応に必要なセラミックハニカム構造体の占める容積が大きくなり過ぎる欠点が生ずるからである。

尚、本発明において使用可能な微生物には酵母菌類、細菌類、放射菌類、カビ類等があり、酵素は微生物が固有に含んでいる酵素である。

#### (実施例)

以下、本発明を実施例により説明する。

#### 実施例1

アルコール発酵酵母サッカロミセス セルビシエを培養液（酵母エキス $0.15\%$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl } 0.25\%$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 0.55\%$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } 0.025\%$ 、 $\text{NaCl } 0.1\%$ 、 $\text{CaCl}_2 0.001\%$ 、クエン酸 $0.3\%$ ）にpH 5.4で $10^5$ 個/ $\text{ml}$ 懸濁させた。この液中にコーデュライトハニカム構造体を浸漬し、しかし後に15分間アスピレータにより真空脱氣しながらセラミックハニカム構造体の細孔内部に液を浸透させた。次いで30℃恒温槽中で3日間浸漬培養し、酵母を増殖、固定化させた。尚、使用した21種類のセラミックハニカム構造体は第1表に記載する貫通孔の開口長さ、気孔率および平均気孔径を有する。

次いで比較のために従来法の包括法で3種類のバイオリアクタエレメントを製造した。

更に、セラミックハニカム構造体の隔壁中の空隙の割合を示す気孔率は、 $30\% \sim 70\%$ 、好ましくは $40\% \sim 60\%$ である。気孔率が $30\%$ に満たないと反応に必要な微生物量が足りなく、一方 $70\%$ を超えるとセラミックスハニカム構造体の強度が低くなる問題が生じてくるからである。

本発明におけるバイオリアクタエレメントの製造法においては、微生物懸濁液の温度を $25 \sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ 、液粘度を $0.5 \sim 30\text{ c.p.}$ とする。またセラミックハニカム構造体の細孔内部に液を浸透させる際、アスピレータ等による真空脱氣法を利用すればセラミックハニカム構造体の細孔内部の気泡を容易に除去でき、これに伴い微生物の送入が速やかに行われる。この場合、セラミックハニカム構造体は脱氣される気泡が抜け易いようにセラミックハニカム構造体の貫通孔が上下方向となるように配置する。

次いで、微生物の培養においては、振盪培養して微生物を増殖させ、細孔内部に微生物を充満させるのが好ましい。

先ず、この内の2種類は、酵母 $30\%$ 懸濁液と3重量%アルギン酸ソーダ水溶液とを温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ にて混合し、ゲル状液とした後にこの液中にセラミックハニカム構造体を浸漬し、次いで付着ゲルの余分を圧縮空気により吹き払うことにより製造した。残りの1種は、同様のゲル状混合物を用い、これを硫酸アルミニウム3重量%溶液中に滴下してビーズ状固定化微生物として得た。

以上のようにして製造した各種バイオリアクタエレメントにつき、直径 $5\text{ cm}$ 、長さ $30\text{ cm}$ の反応管を用い、この反応管の下部から20重量%のグルコース水溶液を $40\text{ ml/hr}$ で流入し、15日間連続置換した後エタノール生産量を比較した。得られた結果を第1表に示す。

第 1 表

	番号	ハニカムセル開口長さ [mm]	気孔率 [%]	平均気孔径 [μm]	エタノール生産量 [mg/ml · hr]
本発明品	1	0.8	30	30	5.21
	2	1	20	30	5.19
	3	1	30	20	5.27
	4	1	30	30	5.47
	5	1	40	50	5.70
	6	1	50	10	5.25
	7	1	50	30	5.67
	8	1	50	50	5.80
	9	1	50	70	6.02
	10	1	50	100	5.92
	11	1	50	120	5.56
	12	1	60	70	6.15
	13	1	70	70	6.30
	14	2	40	50	5.57
	15	2	50	50	5.70
	16	2	50	70	5.81
	17	3	40	40	5.47
	18	3	50	60	5.61
	19	5	40	40	5.30
	20	5	50	50	5.46
	21	7	50	50	5.05
比較品	1	5	50	50	4.52
	2	7	50	50	4.38
3 ピーズ 平均径 3 mm					3.89

注) エタノール生産量は、1時間当たり反応器容積 1 mm<sup>3</sup> に生成される量を示す。

第1表の結果から明らかなように、本発明におけるバイオリアクタエレメントの方が従来法におけるバイオリアクタエレメントよりもエタノール生産性が高かった。

これは、本発明品が直接担体に吸着されている為、従来品に比べ細かい貫通孔の開口長さのセラミックハニカム構造体に固定化でき、単位容積あたりの有効表面積が高いこと、セラミックハニカム構造体の気孔率が大きく固定化される酵母量が多いこと、セラミックハニカム構造体の平均気孔径が酵母の固定化に最適であること、セラミックハニカム構造体が平行な貫通孔を有する形状である為、流体の摩擦による酵母の遊離が少ないと、ピーズに比較して発生するガス気泡の上昇が容易で、逆混合がおこりにくくことなどによる。

#### 実施例 2

貫通孔の開口長さ 5 mm、気孔率 50% および平均気孔径 50 μm のセラミックハニカム構造体を使用し、実施例 1 と同様にして本発明における物理的吸着法および従来法における包括法で夫々バイオ

リアクタエレメントを製造した。更にまた、実施例 1 と同様にしてピーズ平均径 3 mm のピーズ状バイオリアクタエレメントを製造した。

これらバイオリアクタエレメントにつき、実施例 1 と同様のエタノール発酵においてその経時変化を見る為に 100 日間連続発酵させた場合のエタノール生産量を測定した。

得られた結果を第1図に比較して示す。

第1図の結果から明らかなように、本発明により製造したバイオリアクタエレメントの方が、従来法のそれに比べて短い日数で安定生産領域に入り、かつ長期間高濃度のアルコールを生産し続けていることが分かる。これはセラミックハニカム構造体の気孔率が大きく、特に本発明品においては気孔径も酵母の固定化に最適であり、かつ酵母が直接グルコース溶液と接している為、酵母の増殖が速いと考えられる。また本発明品においては、酵母がセラミックハニカム構造体の細孔内に固定化されている為、グルコース溶液により流出しにくく、またセラミックハニカム構造体の機械的強

度が強い為、活性が低下しないと考えられる。

### 実施例 3

酢酸菌アセトバクター アセチを前培養培地A (1 ℥中、グルコース10g、ポリペプトン10g、酵母エキス10g、エタノール20ml、氷酢酸10g)に10<sup>6</sup> 個/ml懸濁させた。この液中に、貫通孔の開口長さ1mm、気孔率50%、平均気孔径50μmのコージェライト質セラミックハニカム構造体を浸漬し、30℃、pH=3.3で4日間静置培養した。その後セラミックハニカム構造体を前培養培地B (1 ℥中、グルコース10g、ポリペプトン10g、酵母エキス10g、エタノール40ml、氷酢酸10g)に移し、30℃、pH=3.3で36時間浸漬培養した。このようにして得られたバイオリアクタエレメントを、直径5cm、長さ20cmの管型反応管に入れ、反応管下部から、前培養培地B組成の液を50cc/hrの速さで送入すると共に、空気を250cc/minの速さで送入した。温度30℃、pH=3.3に保ち酢酸菌による酢酸発酵を行い、反応器出口での酢酸濃度を測定した。また比較品として、3重量%アルギン酸ソーダで

酢酸菌を3mmのビーズに包括固定化し、本実施例と同じ条件で酢酸発酵を行った。これら結果を第2表に比較して示す。

第 2 表

固定化微生物	酢酸生成濃度(重量%)
本発明品	4.7
比較品	3.8

第2表の結果から明らかなように、本発明品は比較品に比べ酢酸濃度が高かった。これはビーズの場合、反応管に送り込まれる空気により反応液が乱れ、逆混合が発生する為、またセラミックハニカム構造体の貫通の開口長さが短く、反応に関与している酢酸菌の付着面積が高い為と考えられる。

### (発明の効果)

本発明によるバイオリアクタエレメントは従来のバイオリアクタエレメントに対し、セラミックハニカム構造体の貫通孔の隔壁面上に微生物を吸着

させた結果、次の効果を有する。

- (1) 貫通孔の開口長さが短いセラミックハニカム構造体を固定化担体として用いている為、単位容積あたりの微生物と溶液との接触面積が大きく、反応効率が高い。
- (2) セラミックハニカム構造体が平行な貫通孔を有し、かつセラミックハニカム構造体の貫通孔の隔壁面上に微生物が固定化される為、溶液の流れの摩擦による微生物の遊離が少ない。
- (3) セラミックハニカム構造体の貫通孔の隔壁面上に微生物を吸着させている為、反応の立上りが速く、また機械的強度が強く、長期間活性が低下しない。
- (4) セラミックハニカム構造体が平行な貫通孔を有する為、ガスが発生する発酵系において発生したガスは、貫通孔内を通じて容易に上昇、散出する為、反応の乱れ、逆混合の発生が少なく、また固形物などによる流路の閉塞が少ない。この結果圧力損失も小さい。

従って、本発明によれば各種のバイオリアクタ

エレメントに有効に利用でき、特に反応中のガス発生を伴うアルコール発酵や空気を必要とする酢酸発酵および基質が高粘性である澱粉の糖化反応等に有効である。

### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、日数とエタノール生成量との関係を示すグラフである。

特許出願人 日本碍子株式会社

代理人弁理士 杉 村 晓 秀



同 弁理士 杉 村 興 作



第1図

